

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Juli 2005 (14.07.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/063966 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 5/06**,
G01N 33/569, 33/68, A61K 38/17

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014673

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Dezember 2004 (23.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 61 444.3 23. Dezember 2003 (23.12.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **AXARON BIOSCIENCE AG** [DE/DE]; Im Neuen-
heimer Feld 515, 69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MAURER, Martin**,
H. [DE/DE]; Max-Reger-Strasse 26, 69121 Heidelberg
(DE). **FELDMANN, Robert, E.** [DE/DE]; Kreidelstrasse
4, 65193 Wiesbaden (DE). **KUSCHINSKY, Wolfgang**
[DE/DE]; Am Aukopf 20, 69118 Heidelberg (DE).
SCHNEIDER, Armin [DE/DE]; Am Büchsenackerhang,
69118 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: **ISENBRUCK, Günter**; Isenbruck, Bösl,
Hörschler, Wichmann, Huhn, Theodor-Heuss-Anlage 12,
68165 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 27. Oktober 2005

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IN VITRO DIFFERENTIATION OF NEURONAL STEM CELLS OR CELLS DERIVED FROM NEU-
RONAL STEM CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IN VITRO DIFFERENZIERUNG NEURONALER STAMMZELLEN ODER VON NEU-
RONALEN STAMMZELLEN ABGELEITETER ZELLEN

(57) Abstract: The method for in vitro differentiation of neuronal stem cells comprises the following: the cells are brought into
contact with a substance which inhibits a reaction of the Wnt signal transduction path, and said cells are cultivated in conditions
enabling the cells to multiply and/or differentiate. In a preferred embodiment of the method, the neuronal stem cells differentiate
to form cells which are similar to brain cells.

(57) Zusammenfassung: Das Verfahren zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen umfasst das in Kontakt bringen
der Zellen mit einer Substanz, die eine Reaktion des WntSignaltransduktionswegs inhibiert, und das Kultivieren dieser Zellen unter
Bedingungen, die eine Vermehrung und/oder Differenzierung der Zellen ermöglichen. In einer bevorzugten Ausführungsform des
Verfahrens differenzieren die neuronalen Stammzellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen.



WO 2005/063966 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014673

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 G01N33/569 G01N33/68 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/57248 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE; MCMAHON, ANDREW, P; LEE, SCO) 11 November 1999 (1999-11-11) the whole document	1-12,16, 25-31
A	CARICASOLE ANDREA ET AL: "Functional characterization of WNT7A signaling in PC12 cells. Interaction with a FZD5cntdotLRP6 receptor complex and modulation by Dickkopf proteins." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 39, 26 September 2003 (2003-09-26), pages 37024-37031, XP002321048 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-12,16, 25-31
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2005

Date of mailing of the international search report

19. 07. 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Döpfer, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/014673

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEIDENSTICKER M J ET AL: "Biochemical interactions in the wnt pathway" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - MOLECULAR CELL RESEARCH 2000 NETHERLANDS, vol. 1495, no. 2, 2000, pages 168-182, XP004278102 ISSN: 0167-4889 the whole document -----	1
A	CATTANEO E ET AL: "PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF NEURONAL STEM CELLS REGULATED BY NERVE GROWTH FACTOR" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 347, 25 October 1990 (1990-10-25), pages 762-765, XP002911519 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1
A	KAWANO YOSHIKI ET AL: "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 116, no. 13, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 2627-2634, XP002321050 ISSN: 0021-9533 the whole document -----	1,6,10, 11,25-31
P,A	US 6 686 198 B1 (MELTON DOUGLAS A ET AL) 3 February 2004 (2004-02-03) the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/014673**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-12, 16, 25-31

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box III

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-12, 16 and 25-31

Process for the *in vitro* differentiation of neuronal stem cells by inhibition of the *Wnt* signal transduction pathway; screening process for *Wnt* signal transduction pathway inhibitors; *in vitro* differentiation of recombinant neuronal stem cells using nucleic acid constructs which code for proteins that inhibit the *Wnt* signal transduction pathway.

2. Claims 13-15

Differentiated neuronal cells, pharmaceuticals containing them and tissue replacement.

3. Claims 17-21

Pharmaceuticals containing glycogen synthase kinase-3 inhibitors, frizzled receptor antagonists and/or antibodies to proteins of the *Wnt* signal transduction pathway.

4. Claims 22-23

Screening process for detecting brain-like cells by measuring the concentration of β -catenin.

5. Claim 24

Use of β -catenin as a diagnostic marker for identifying brain-like cells and brain cells.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/014673

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957248	A	11-11-1999	WO 9957248 A1	11-11-1999
US 6686198	B1	03-02-2004	US 2004087509 A1	06-05-2004
			AU 701623 B2	04-02-1999
			AU 7980694 A	04-05-1995
			CA 2174098 A1	20-04-1995
			EP 0726948 A1	21-08-1996
			JP 9503673 T	15-04-1997
			WO 9510611 A1	20-04-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014673

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/06 G01N33/569 G01N33/68 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N G01N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EP0-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99/57248 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE; MCMAHON, ANDREW, P; LEE, SCO) 11. November 1999 (1999-11-11) das ganze Dokument	1-12,16, 25-31
A	----- CARICASOLE ANDREA ET AL: "Functional characterization of WNT7A signaling in PC12 cells. Interaction with a FZD5cndotLRP6 receptor complex and modulation by Dickkopf proteins." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 278, Nr. 39, 26. September 2003 (2003-09-26), Seiten 37024-37031, XP002321048 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument ----- -/-	1-12,16, 25-31

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. März 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19. 07. 2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Döpfer, K-P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SEIDENSTICKER M J ET AL: "Biochemical interactions in the wnt pathway"</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - MOLECULAR CELL RESEARCH 2000 NETHERLANDS, Bd. 1495, Nr. 2, 2000, Seiten 168-182, XP004278102</p> <p>ISSN: 0167-4889</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1
A	<p>CATTANEO E ET AL: "PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF NEURONAL STEM CELLS REGULATED BY NERVE GROWTH FACTOR"</p> <p>NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 347, 25. Oktober 1990 (1990-10-25), Seiten 762-765, XP002911519</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1
A	<p>KAWANO YOSHIAKI ET AL: "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway."</p> <p>JOURNAL OF CELL SCIENCE, Bd. 116, Nr. 13, 1. Juli 2003 (2003-07-01), Seiten 2627-2634, XP002321050</p> <p>ISSN: 0021-9533</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1,6,10, 11,25-31
P,A	<p>US 6 686 198 B1 (MELTON DOUGLAS A ET AL)</p> <p>3. Februar 2004 (2004-02-03)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-12, 16, 25-31

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-12,16,25-31

Verfahren zur in-vitro-Differenzierung neuronaler Stammzellen durch Inhibierung des Wnt-Signaltransduktionsweges; Screeningverfahren für Hemmer des Wnt-Signaltransduktionsweges; In-vitro-Differenzierung rekombinanter neuronaler Stammzellen mit Nukleinsäurekonstrukten, die für Proteine kodieren, die den Wnt-Signaltransduktionsweg hemmen

2. Ansprüche: 13-15

Differenzierte neuronale Zellen, selbige enthaltende pharmazeutische Mittel und Gewebeersatz

3. Ansprüche: 17-21

Pharmazeutische Mittel enthaltend Inhibitoren der Glykogen-Syntase-Kinase-3, Antagonisten des Rezeptors Frizzled und/oder Antikörper gegen Proteine des Wnt-Signaltransduktionsweges

4. Ansprüche: 22-23

Screeningverfahren zum Nachweis gehirnnähnlicher Zellen durch Bestimmung der der Konzentration von beta-Catenin

5. Anspruch: 24

Verwendung von beta-Catenin als diagnostischem Marker zur Identifizierung von gehirnnähnlichen Zellen und Gehirnzellen

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014673

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument			Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung	
WO	9957248	A	11-11-1999		WO	9957248 A1	11-11-1999	
US	6686198	B1	03-02-2004		US	2004087509 A1	06-05-2004	
					AU	701623 B2	04-02-1999	
					AU	7980694 A	04-05-1995	
					CA	2174098 A1	20-04-1995	
					EP	0726948 A1	21-08-1996	
					JP	9503673 T	15-04-1997	
					WO	9510611 A1	20-04-1995	